

PENGARUH LOGAM DAN KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP PERTUMBUHAN DAN AKTIVITAS BAKTERI PROTEOLITIK PADA PROSES DEPROTEINASI CANGKANG RAJUNGAN

Joko Prayitno Susanto¹⁾ dan Nida Sopiah²⁾

Peneliti di Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Lingkungan- BPPT¹⁾
dan Balai Teknologi Lingkungan BPPT-Puspitek²⁾.

Abstrak

Dalam penelitian ini telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan ion-ion logam di dalam media padat terhadap pertumbuhan bakteri protease, serta pengujian pengaruh konsentrasi substrat protein dalam media cair terhadap aktivitas proteolitik bakteri. Penambahan ion logam Mn, Co, Cu dan Zn ke dalam media padat telah mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri protease yang ditunjukkan melalui peningkatan jumlah produksi enzim ekstraseluler disekitar tempat tumbuh isolat. Diantara ion-ion logam yang digunakan, ion Mn memberikan hasil yang sangat baik dibanding dengan ion-ion lainnya. Penambahan konsentrasi substrat protein pada media cair sebanyak 24%~40% telah mampu meningkatkan aktivitas protease bakteri, sedangkan penambahan 8%~16% substrat ini justru menghambat aktivitas bakteri. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk mengoptimalkan proses pembuatan chitin dengan bahan baku limbah cangkang rajungan secara biologis, yang dipandang sebagai proses yang lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan proses secara kimiawi.

Kata kunci: bakteri protease, aktivitas proteolitik, isolat cangkang udang, isolat cangkang rajungan, ion logam, substrat protein

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Limbah cangkang rajungan yang merupakan hasil sisa produksi pengolahan industri pengolahan hasil perikanan, merupakan salah satu potensi kekayaan alam yang belum banyak dimanfaatkan. Keberadaan limbah ini lebih banyak dianggap sebagai permasalahan yang berpotensi mencemari lingkungan, bila dipandang sebagai potensi kekayaan alam yang perlu dikelola untuk meningkatkan kesejahteraan masyarakat.

Sebagai bahan organik yang tidak terolah, pembuangan cangkang rajungan akan mengganggu lingkungan sekitar industri, terutama membuat bau yang tidak sedap dan pencemaran terhadap perairan seperti meningkatnya kandungan BOD₅, COD dan TSS perairan disekitar pabrik. Namun demikian, disisi lain apabila limbah ini dikelola dan diolah secara tepat, dapat memberikan

nilai ekonomi, untuk meningkatkan keuntungan industri pengolahan rajungan.

Sebagai salah satu komoditas ekspor unggulan, menurut data BPS⁽¹⁾ nilai ekspor rajungan pada tahun 1993 mencapai 1,042 milyar dolar US, dan nilai ini selalu meningkat dari tahun ke tahun. Sebagian besar, rajungan ini diekspor dalam bentuk rajungan beku tanpa kepala dan kulit. Pada tahun 1993, produksi rajungan yang diekspor dalam bentuk tanpa kepala dan kulit adalah sebanyak 442,724 ton. Dengan demikian jumlah limbah yang berupa kepala, kulit, ekor maupun kaki rajungan yang umumnya 25-50 % dari berat, sangat berlimpah.

Dengan kandungan komponen chitin sebesar 20 - 30% disamping komponen-komponen lain seperti protein, CaCO₃, MgCO₃ serta sedikit pigmen astaxanthin, para industriawan mulai merubah pandangan terhadap cangkang rajungan ini dari limbah menjadi suatu potensi.

Chitin $[(C_8H_{13}NO_5)_n]$ merupakan bahan polisakarida yang dapat diolah lebih lanjut menjadi chitosan $[(C_6H_{11}NO_4)_n]$ yang mempunyai nilai ekonomis cukup tinggi dan banyak diperlukan di berbagai bidang antara lain :

- Bidang kedokteran, obat-obatan dan farmasi, seperti sebagai bahan pencampur obat, kontak lensa, kulit buatan, bahan kosmetik dll.
- Bidang Industri dan pengolahan limbah, seperti sebagai bahan penyerap logam berat, bahan fiber, film, membran, pencampur cat, pembersih pada industri tekstil dll.
- Pertanian, seperti sebagai bahan pestisida, herbisida dll.

Proses pembuatan chitin dari cangkang rajungan ini, pada umumnya banyak dilakukan melalui proses kimiawi^(2,3,4). Penulis dkk⁽⁵⁾ juga telah mengembangkan metoda pembuatan chitin secara kimiawi, yang meliputi proses deproteinisasi dan demineralisasi untuk memperoleh kondisi optimum pembuatan chitin dari limbah rajungan.

Namun dalam perkembangannya, produk chitin maupun chitosan yang diperoleh melalui proses kimiawi ini mempunyai banyak kelemahan. Salah satu kelemahannya adalah nilai berat molekul yang diperoleh sangat rendah yang diakibatkan oleh penggunaan basa kuat (NaOH) pada proses deproteinisasi maupun penggunaan asam kuat (HCl) pada proses demineralisasinya. Penggunaan kedua bahan kimia ini telah diketahui sebagai penyebab putusnya ikatan polimer pada senyawa chitin sehingga nilai BM yang diperoleh sangat rendah.

Perkembangan ilmu bioteknologi telah menempatkan penggunaan enzim (dalam hal ini bakteri) sebagai salah satu alternatif untuk mengatasi kelemahan tersebut. Melalui proses enzim dimungkinkan putusnya ikatan polimer pada senyawa chitin dapat dihindari, sehingga dapat diperoleh chitin dengan berat molekul lebih besar dari 800.000.

1.2. Tinjauan Pustaka

Enzim adalah suatu kelompok protein majemuk (holoenzim) yang terdiri dari protein (apoenzim) dan suatu gugus bukan protein (kofaktor), bersifat biokatalis yang dapat

menurunkan energi aktivasi suatu reaksi yang dikatalisisnya, baik reaksi kimia yang membutuhkan energi (endogenik) maupun reaksi yang menghasilkan atau mengeluarkan energi (eksogenik). Energi aktivasi adalah energi yang dibutuhkan dalam suatu tumbukan antara 2 molekul dalam suatu reaksi. Pada saat energi aktivasinya lebih rendah dari reaksi yang tidak dikatalisis, enzim bergabung dengan substrat yang spesifik membentuk kompleks enzim-substrat, selanjutnya substrat membentuk suatu produk tertentu. Hubungan antara substrat dengan enzim hanya terjadi pada bagian atau tempat tertentu saja. Tempat atau bagian enzim yang mengadakan hubungan/kontak dengan substrat dinamai sisi aktif (*active site*).

Salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan untuk kepentingan komersial adalah enzim protease. Enzim ini merupakan enzim degradatif yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein. Menurut *Nomenclature Committee of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, enzim protease dikelompokkan dalam kelas hidrolase karena didalam aktivitasnya membutuhkan H_2O .

Berdasarkan sisi aktif dalam proses pemutusan ikatan peptida, terdapat dua jenis enzim protease, yaitu yang bersifat eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase memutus ikatan peptida pada ujung atau dekat ujung rantai polipeptida baik pada gugus amino maupun gugus karboksilnya, sehingga akan dihasilkan asam amino dan fragmen peptida. Sedangkan endopeptidase memutus ikatan peptida tidak pada ujung rantai polipeptida melainkan pada bagian 'dalam' sehingga akan dihasilkan sejumlah peptida dan polipeptida⁽⁶⁾.

Protease dapat pula dibedakan menjadi proteinase dan peptidase berdasarkan cara hidrolisisnya. Proteinase mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar atau polipeptida, sedangkan peptidase mengkatalisis hidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino^(7,8) diikhtisarkan sebagai berikut :



Laju suatu reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh ion-ion logam tertentu yang diperlukan untuk meningkatkan aktivitasnya, disamping faktor-faktor lain seperti

temperatur, konsentrasi enzim, pH, substrat, dan sebagainya.

Menurut Bailey dan Olis⁽⁹⁾, salah satu karakteristik pembeda enzim dengan katalis sintetik adalah seringnya enzim membentuk kofaktor, yaitu kofaktor logam seperti Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Na^{2+} , Cu^{2+} , dan koenzim yang berupa molekul organik kompleks seperti tiamin pirofosfat, FAD dan koenzim A.

Beberapa enzim membutuhkan baik koenzim maupun satu atau lebih ion logam untuk aktivitasnya. Pada beberapa enzim, koenzim dan ion logamnya terikat lemah atau dalam waktu sementara, akan tetapi pada enzim lain terikat kuat atau terikat secara permanen. Hal ini disebut gugus prostetik. Koenzim dan ion logam bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian protein enzim akan terdenaturasi oleh pemanasan⁽¹⁰⁾.

Disamping logam yang dapat berfungsi untuk membentuk kofaktor pada reaksi enzimasinya tersebut, pertumbuhan dan aktivitas proteolitik bakteri sangat tergantung pada kandungan unsur hara yang terdapat dalam substrat yang digunakan.

Penggunaan bakteri sebagai penghasil enzim yang diperlukan untuk pembuatan chitin telah dilaporkan oleh beberapa peneliti seperti Shimahara et al⁽¹¹⁾ yang memanfaatkan bakteri *Proteolitik pseudomonas maltophilia* LC 102 untuk deproteinasi cangkang udang (*Penaeus japonicus*); dan Santoso⁽¹²⁾ dengan memanfaatkan enzim Actinase E dari *Streptomyces griseus* untuk deproteinasi udang *Penaeus merguensis*.

Penulis dkk^(13,14), telah mencoba mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri proteolitik yang terdapat di dalam hasil pembusukan cangkang rajungan dan cangkang udang yang diperlukan pada proses deproteinasi pembuatan chitin dari cangkang rajungan. Namun pada penelitian tersebut, aktivitas proteolitik bakteri, baik yang berasal dari hasil pembusukan limbah cangkang rajungan maupun cangkang udang, masih sangat rendah untuk dapat digunakan pada proses pembuatan chitin.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan pertumbuhan bakteri hasil isolasi dari limbah rajungan dan udang

melalui penambahan ion logam serta untuk meningkatkan aktivitas proteolitik bakteri tersebut melalui optimalisasi konsentrasi substrat yang digunakan.

2. METODA PENELITIAN

2.1. Bahan dan Peralatan

a. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil skrining dan isolasi bakteri yang terdapat dalam limbah cangkang rajungan dan cangkang udang hasil pembusukan selama 3 minggu.

b. Medium

Untuk meneliti pengaruh penambahan ion logam terhadap pertumbuhan bakteri, digunakan medium padat yang cocok untuk pertumbuhan koloni bakteri hasil diisolasi dari pembusukan limbah cangkang rajungan dan cangkang udang hasil penelitian sebelumnya^(13,14), yaitu dengan komposisi dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan, 5 g glukosa, 5 g NaCl, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 .

Sedangkan untuk meneliti pengaruh substrat terhadap aktivitas mikroba, digunakan medium kultur cair yang dibuat dengan komposisi bahan kimia yang sama dengan medium padat di atas.

c. Bahan baku

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang rajungan yang diperoleh dari industri pengolahan rajungan yang sudah mengalami proses perebusan dan pengeringan dengan sinar matahari. Cangkang rajungan dengan kadar air $\leq 5\%$ selanjutnya dihancurkan dengan alat penghancur (*blender*) sampai menjadi serbuk halus.

d. Peralatan

Peralatan laboratorium yang digunakan adalah alat gelas meliputi cawan petri, labu erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, pipet ukur, pipet volumetrik, *autoclave*, *centrifuge*, *hot plate*, inkubator, *laminar air flow*, mikroskop, neraca analitis oven, pH meter, *rotatory shaker incubator*, shaking waterbath, spektrofotometer UV-Vis, dan vortex.

2.2. Tata Kerja

a. Pengaruh Ion Logam Terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik.

Untuk menguji pengaruh penambahan logam terhadap pertumbuhan bakteri, dilakukan tahap-tahap penelitian sebagai berikut :

1. Hasil isolasi bakteri pada medium padat yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya^(13,14), di inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
2. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium padat diinokulasikan kembali dalam medium yang sama dengan penambahan berbagai jenis ion logam yang berbeda, masing-masing sebanyak 0,002% (b/v). (logam-logam yang diuji pengaruhnya terhadap pertumbuhan bakteri ini adalah Mn, Co, Cu, dan Zn).
3. Pengaruh penambahan logam terhadap pertumbuhan bakteri diamati melalui perbandingan zona bening (zona hidrolisis) didaerah sekitar bakteri tumbuh yang dihasilkan pada medium padat sebelum penambahan logam dan setelah penambahan logam.
4. Koloni bakteri yang menunjukkan pertumbuhan lebih baik pada medium yang telah diberi tambahan logam, selanjutnya digunakan sebagai sumber bakteri untuk penelitian selanjutnya.

b. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Proteolitik Bakteri Protease.

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas proteolitik bakteri protease, dilakukan tahap-tahap penelitian sebagai berikut :

1. Pada setiap medium cair yang diuji ditambahkan logam Mn sebanyak 0,002% (b/v) dan substrat protein dari serbuk cangkang rajungan yang dilarutkan sebanyak 40% (b/v). Medium tersebut selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, dan dilakukan pengenceran secara aseptis dengan konsentrasi 40%, 32%, 24%, 16% dan 8%.
2. Koloni yang mempunyai pertumbuhan baik dari hasil pengujian pengaruh logam diatas, selanjutnya dipindahkan sebanyak

2 ose ke media-media kultur cair pada konsentrasi substrat berbeda,

3. Aktivitas proteolitik pada masing-masing media cair dianalisa pada setiap 24 jam, dan dihentikan setelah aktivitas proteolitik mengalami penurunan. Metode pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode yang sama dengan penelitian sebelumnya^(13,14).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Pengaruh Ion Logam Terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik.

Dari hasil penelitian sebelumnya^(13,14), diperoleh 3 isolat yang mempunyai pertumbuhan yang cukup baik, akan tetapi untuk meningkatkan pertumbuhannya masih perlu diberikan tambahan lain. Salah satu faktor yang dapat meningkatkan kemampuan enzim ini adalah ion logam.

Untuk mengetahui peningkatan pertumbuhan bakteri terhadap penambahan logam pada medium padat, dalam penelitian ini digunakan 2 (dua) dari 3 (tiga) isolat yang diperoleh pada penelitian sebelumnya^(13,14) sebagai bahan pengujian.

Ion logam yang digunakan dalam percobaan ini meliputi, Mn, Co, Cu dan Zn dengan menggunakan pembandingan medium padat yang tidak mendapatkan perlakuan ion logam. Hasil penelitian dapat dilihat dalam tabel 1. dan Tabel 2.

Tabel 1. Pengaruh Ion Logam Terhadap Pertumbuhan Bakteri

Sumber Isolat	Ion logam				
	Mn	Co	Cu	Zn	Non
Udang	+++	+++	+++	+++	+++
Rajungan	+++	+++	+++	+++	+-

Keterangan :
+++ = baik; ++ = sedang; + = sedikit; +- = kurang.

Tabel 2. Pengaruh Ion Logam Terhadap Luasnya Zona Hidrolisis

Sumber Isolat	Ion logam				
	Mn	Co	Cu	Zn	Non
Udang	+++	++	++	++	++
Rajungan	+++	++	+++	++	+-

Keterangan :
+++ = baik; ++ = sedang; + = sedikit; +- = kurang.

Dari kedua tabel tersebut tampak bahwa kedua isolat dapat tumbuh dengan baik dan menghasilkan enzim ekstraseluler disekitar tempat tumbuh isolat. Luas zona hidrolisis pada medium yang diberikan perlakuan dengan ion logam Mn sebesar 0,002% lebih luas dibandingkan pada medium dengan penambahan ion-ion logam Co, Cu, Zn maupun medium yang tidak diberikan perlakuan.

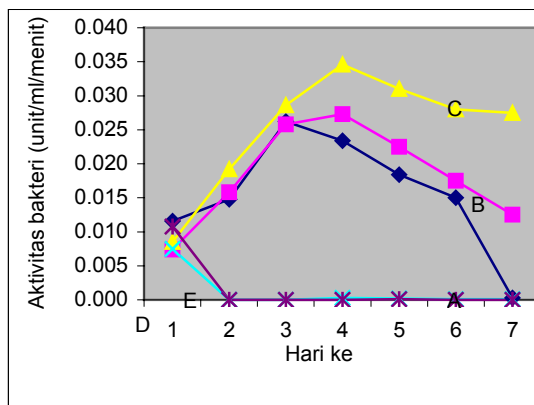
Pada medium yang diberikan perlakuan ion logam Co kedua isolat memberikan respon yang baik terhadap pertumbuhan koloni. Medium dengan perlakuan ion logam Cu, kedua isolat memberikan respon yang baik terhadap pertumbuhan koloni. Luas zona hidrolisis untuk isolat yang berasal dari limbah cangkang udang luas zona hidrolisis sedang sedangkan isolat yang berasal dari limbah cangkang rajungan memberikan zona hidrolisisnya baik. Medium dengan perlakuan ion logam Zn ketiga isolat memberikan respon yang baik terhadap pertumbuhan koloni. Luas zona hidrolisis kedua isolat memberikan luas zona hidrolisis sedang.

Lebih lanjut, medium yang tidak diberikan perlakuan ion logam isolat yang berasal dari limbah cangkang udang pertumbuhan koloninya baik sedangkan untuk isolat yang berasal dari limbah cangkang rajungan. pertumbuhan koloninya kurang. Luas zona hidrolisis untuk isolat yang berasal dari limbah cangkang udang luas zona hidrolisis sedang sedangkan isolat yang berasal dari limbah cangkang rajungan memberikan zona hidrolisisnya kurang.

Dari hasil ini tampak bahwa peran penambahan ion logam sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri protease. Hal ini sangat terkait dengan reaksi enzimatik, dimana ion logam sangat berperan sebagai dalam pembentukan kofaktor logam maupun ikatan koenzim-logam yang sangat stabil.

b. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Proteolitik Bakteri Protease.

Untuk menguji pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas proteolitik bakteri protease, dalam penelitian ini digunakan isolat bakteri yang berasal dari limbah cangkang rajungan.



Keterangan : A (40%), B (30%), C (24%), D (16%) dan E (8%)

Gambar 1. Aktivitas Protease Isolat dari Limbah Cangkang Rajungan pada Berbagai Konsentrasi Substrat Protein.

Gambar 1 diatas menunjukkan bahwa aktivitas protease isolat sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat protein yang digunakan dalam media cair.

Pada hari pertama, meskipun secara umum telah menunjukkan aktivitasnya, namun aktivitas ini masih sangat rendah untuk semua konsentrasi substrat yang digunakan. Pada hari kedua pengamatan, tampak dua fenomena yang berbeda ditunjukkan oleh media yang menggunakan konsentrasi substrat 8 ~ 16% dan media yang menggunakan konsentrasi substrat 32%~40%. Untuk media dengan konsentrasi 8~16% menunjukkan aktivitas yang menurun dan cenderung tidak menunjukkan aktivitas pada hari-hari berikutnya. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi justru terjadi peningkatan aktivitas berlanjut hingga hari ke 3 untuk media dengan konsentrasi 40% dan hari ke 4 untuk konsentrasi 32% dan 24%, sebelum mengalami penurunan pada hari berikutnya.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, dapat diterangkan bahwa pada konsentrasi substrat yang rendah (8~16%), pH media cenderung rendah/menurun pada kisaran 5~6 sebagai akibat dari proses pemecahan glukosa menjadi asam-asam organik. Sedangkan pada konsentrasi substrat tinggi (24~40%), pH media cenderung stabil pada pH 8, karena pada konsentrasi substrat yang tinggi, disamping terjadi pemecahan glukosa menjadi asam-asam organik, juga terjadi proses hidrolisis

protein yang menghasilkan amoniak. Kedua hasil proses ini akan saling menetralkan, sehingga pH media relatif stabil dibanding dengan media yang menggunakan konsentrasi substrat rendah.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini atas dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut:

- i. Penambahan ion logam telah mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri protease dengan baik
- ii. Ion Mn telah memberikan dampak penumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan ion-ion lainnya untuk kedua isolat yang digunakan
- iii. Penambahan konsentrasi substrat pada media cair sebanyak 24%~40% telah mampu meningkatkan aktivitas protease bakteri, sedangkan penambahan 8%~16% substrat justru menghambat aktivitas bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, 1993, Biro Pusat Statistik, Jakarta.
2. Knorr, Dietrich, 1983, *Dye Binding Properties of Chitin and Chitosan*, Journal of Food Science, Vol. 43.
3. No, hong K., 1989, *Isolation and Characterization of Chitin from Crowfish Shell Waste*, Journal of Agriculture Food Chemistry.
4. Murzzarelli, R.A.A., 1985, *New Derivative of Chitin and Chitosan*, *New Developments in Industrial Poly saccharides*, Gordan and Beach Science Publishing, New York,.
5. Prayudi,T dan J.P. Susanto, 2000, *Penerapan Produksi Bersih Pada Industri EksporHasil Perikanan*, Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pengolahan Limbah dan Pemulihan Kerusakan Lingkungan, Direktorat Teknologi Lingkungan-BPPT, Jakarta.
6. Rao, M.B., A.M. Tangsale, M.S. Ghasge and V.V. Deshpande, 1998, *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*, Microb. Mol. Biol.Rev, 62 (3): 597-663.
7. Pelczar, M.J.Jr., and E.C.S. Chan, 1981, *Elements of Microbiology*, International Student Edition, McGraw-Hill, Inc.
8. Fraazier, W.C. and D.C. Westhoff, 1983, *Food Microbiology*, Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi.
9. Bailey, J.E. and D.F. Olis, 1988, *Dasar-dasar Rekayasa Biokimia*, Terjemahan A.A., Darwis, Liesbetini, I. Sailah dan L. Herlina", PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
10. Suhartono, M.T., 1993, *Telaah Formulasi Aditif di dalam Peningkatan Daya Simpan Protease Bacillus sp.*, Laporan Penelitian. Fateta IPB.
11. Shimahara, K., Takiguchi, K., Kitamura, K. and Okada, O., 1984, *Chemical Composition And Some Properties of Crustacean Chitin*, *Prepared Use of Proteolytic of Pseudomonas Maltophilia LC-102*. In *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*, p. 239, Zikakis, J.P. (ed). Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, New York.
12. Santoso, U., 1990, *Studi tentang chitin cangkang udang (Penaeus merguensis) I : Isolasi menggunakan Actinase E dan EDTA*, Agritech 10 (3).
13. Sopiah, N. dan J.P. Susanto, 2002, *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Terhadap Deproteinasi Limbah Cangkang Rajungan Pada Proses Pembuatan Chitin*, Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia, Vol. 3, Nomor 5, BPPT, Jakarta.
14. Sopiah, N. dan T. Prayudi, 2002, *Uji Aktivitas Proteolitik Bakteri Dari Limbah Cangkang Udang Pada Proses Pembuatan Chitin*, Jurnal Teknologi Lingkungan, Vol. 3 Nomor 3, BPPT, Jakarta,.